

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 3 月 14 日 (14.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/20561 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 7/08, (74) 代理人: 弁理士 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号 SVAX TSビル Tokyo (JP).  
A61K 38/04, A61P 31/18, C12N 9/99
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/07668
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 5 日 (05.09.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-269296 2000 年 9 月 5 日 (05.09.2000) JP  
特願2001-92306 2001 年 3 月 28 日 (28.03.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP]; 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤井信孝 (FUJII, Nobutaka) [JP/JP]; 〒520-0248 滋賀県大津市仰木の里東6丁目5-3 Shiga (JP).
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 02/20561 A1

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDES AND ANTI-HIV DRUGS CONTAINING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規ポリペプチド及びこれを含む抗HIV剤

(57) Abstract: Polypeptides of A1-Arg-A2-Cys-Tyr-A3-A4-X-A5-A6-Cit Cys-A7 (I) or their salts (wherein A1 is hydrogen or a residue of arginine, lysine, ornithine, citrulline, alanine, or the like; A2 is an aromatic amino acid residue; A3, A4 and A6 are each a residue of arginine, lysine, ornithine, citrulline, or alanine; A5 is a residue of tyrosine, phenylalanine, alanine, naphthylalanine, or citrulline; A7 is a lysine or arginine residue whose carboxyl group may be converted into amido; and X is a residue of D-ornithylproline, prolyl-D-ornithine, D-lysylproline, or the like, with the proviso that any one of A1, A3, A4, A5, A6 and A7 is a residue of alanine or the like or that X is citrulline or the like).

[続葉有]



---

(57) 要約:

本発明は、  $A1-Arg-A2-Cys-Tyr-A3-A4-X-A5-A6-Cit-Cys-A7$

(I)

(式中、A 1 は、水素原子又はアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン、アラニン残基など；A 2 は芳香族アミノ酸残基；A 3、A 4 及びA 6 は、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン又はアラニン残基；A 5 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン又はシトルリン残基；A 7 は、カルボキシル基がアミド化されていてもよい、リジン又はアルギニン残基；X は、D-オルニチル-プロリン、プロリル-D-オルニチン、D-リジル-プロリン残基など；ただし、A 1、A 3、A 4、A 5、A 6 及びA 7 のいずれかはアラニン残基などであるか、又はXがシトルリンなどである) のポリペプチド又はその塩に関する。

## 明 細 書

新規ポリペプチド及びこれを含む抗H I V剤

## 5 技術分野

本発明は、新規ポリペプチド及び該ポリペプチドを有効成分とする抗H I Vウイルス剤等の医薬に関する。

カプトガニ (Tachypleus属、Limulus属並びにCarcinoscopius属) から分離されたエンドトキシン親和性ポリペプチドの抗ウイルス活性 (特開平2-167230号及び特表平2-500194号) が見出されて以来、これらの化学修飾、低分子量化及び上記ポリペプチドの構造を一部改変して新規な抗ウイルス性ポリペプチドの合成が試みられている (WO92/04374、特開平5-163298及び特表平8-504837)。最近、新規な低分子  
10 量抗ウイルス性ポリペプチドT134及びT140が、細胞毒性が低く、  
15 優れた抗H I Vウイルス活性を有するポリペプチドであることが見出された  
(H. Tamamuraら ; Biochemical and Biophysical Research Commun., 253, 877-882 (1998))。しかしながら、これらのT134及びT140も、医薬として用いるには満足できるものではなかった。

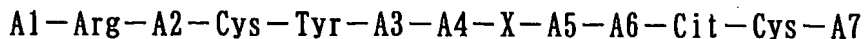
したがって、本発明の目的は優れた抗H I Vウイルス活性を有し、且つ細胞  
20 毒性が低いポリペプチドを提供することである。

本発明者は上記課題の解決に鑑み、鋭意探索を行った。その結果、従来よりCXCR4リガンドに特異的に結合してH I Vの感染を阻害することが知られていたT140のアミノ酸配列を基に、一部のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した新たなポリペプチドが優れた抗H I Vウイルス活性を有し、かつ  
25 細胞毒性が低いことを見い出して本発明を完成した。

## 発明の開示

すなわち本発明は下記式 (I)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



(式中、

A 1 は、水素原子或いはアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン若しくはアラニン残基、又はこれらのアミノ酸のN- $\alpha$ 置換誘導体残基を表

5 し；

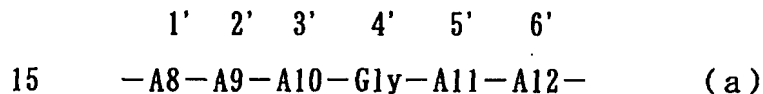
A 2 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

A 3、A 4 及び A 6 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン又はアラニン残基を表し；

A 5 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン又は  
10 シトルリン残基を表し；

A 7 は、カルボキシル基がアミド化されていてもよい、リジン又はアルギニン残基を表し；

X は、下記式 (a)：



(式中、

A 8 及び A 1 2 は、独立して、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システイン、又はメチオニン残基を表し；

A 9 は、芳香族アミノ酸残基を表し、A 1 0 は、A 3 と同一のアミノ酸残  
20 基から選択され、A 1 1 は、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システイン又はメチオニン残基を表すが、但し、1' 位と6' 位が共にシステイン残基である場合には、これらは、ジスルフィド結合により連結していても良い) で示されるペプチド残基、或いはD-オルニチル-プロリン、プロリル-D-オルニチン、D-リジル-プロリン、プロリル-D-リジン、D-アルギニル-プロリン、プロリル-D-アルギニン、D-シトルリル-プロリン、D-シトルリル-アラニン、D-アラニル-シトルリン、プロリル-D-シトルリン、グリシル-オルニチン、オルニチル-グリシン、グリシル-リジン、リジル-グリシン、グリシル-アルギニン、アルギニル-グリシン、グリシル-シ  
25

トルリン、シトルリル-グリシン、D-アラニル-プロリン、及びD-リジ  
ル-アラニンからなる群より選択されるペプチド残基であり、該ペプチド残  
基の構成アミノ酸であるD-アルギニン、L-アルギニン、D-リジン、L  
-リジン、D-オルニチン又はL-オルニチンの側鎖 $\omega$ -アミノ基の水素原  
5 子は $\omega$ -アミノアシル基で置換されていてもよく、これらペプチド残基は7  
位と9位のアミノ酸残基をペプチド結合を介して連結しているペプチド残基  
を示し；

上記式中、A r gはアルギニン残基を示し、C y sはシステイン残基を示  
し、T y rはチロシン残基を示し、C i tはシトルリン残基を示し、G l y  
10 はグリシン残基を示し、4位と12位のシステイン残基はジスルフィド結合  
により連結していても良く；

但し、上記ポリペプチド又はその塩においては

A 1、A 3、A 4、A 5、A 6及びA 7のいずれかのアミノ酸残基がアラ  
ニン若しくはシトルリン残基であるか、又は；

15 XがD-シトルリン、D-アラニン、シトルリン、若しくはアラニン残基  
を含むペプチド残基である）で示されるポリペプチド又はその塩に関する。

本発明の式（I）のポリペプチドにおいて、A 1は、好ましくはアルギニ  
ン、アラニン又はシトルリン残基であり；A 2は好ましくはトリプトファン  
又はナフチルアラニン残基であり；A 3は好ましくはアルギニン、アラニン  
20 又はシトルリン残基であり；A 4は、好ましくは、リジン、アラニン又はシ  
トルリン残基であり；Xは好ましくは、D-リジル-プロリン、D-アラニ  
ル-プロリン、D-リジル-アラニン又はD-シトルリル-プロリン残基で  
あり；A 5は、好ましくはチロシン又はアラニン残基であり；A 6は好まし  
くはアルギニン、アラニン又はシトルリン残基であり；A 7は好ましくはア  
25 ルギニン残基である。

本発明の最も好ましいポリペプチドの具体例は、A 1、A 6及びA 7がア  
ルギニン残基であり、A 2がナフチルアラニン残基であり、A 3がシトルリ  
ン残基であり、A 4がリジン残基であり、XがD-リジル-プロリン残基で  
あり、A 5がチロシン残基である式（I）のポリペプチド、A 1、A 3、A

6 及びA 7がアルギニン残基であり、A 2がナフチルアラニン残基であり、  
A 4がリジン残基であり、XがD-シトルリル-プロリン残基であり、A 5  
がチロシン残基である式 (I) のポリペプチド、A 1、A 6及びA 7がアル  
ギニン残基であり、A 2がナフチルアラニン残基であり、A 3がシトルリン  
5 残基であり、A 4がリジン残基であり、XがD-シトルリル-プロリン残基  
であり、A 5がチロシン残基である式 (I) のポリペプチド、及びA 1がシ  
トルリン残基であり、A 2がナフチルアラニン残基であり、A 3、A 6及び  
A 7がアルギニン残基であり、A 4がリジン残基であり、XがD-シトルリ  
ル-プロリン残基であり、A 5がチロシン残基である式 (I) のポリペプチ  
10 ドである。

本発明の好ましいポリペプチドの他の態様としては、A 1、A 6及びA 7  
がアルギニン残基であり、A 2がナフチルアラニン残基であり、A 3がアラ  
ニン残基であり、A 4がリジン残基であり、XがD-リジル-プロリン残基  
であり、A 5がチロシン残基である式 (I) のポリペプチド、A 1がシトル  
15 リン残基であり、A 2がナフチルアラニン残基であり、A 3、A 6及びA 7  
がアルギニン残基であり、A 4がリジン残基であり、XがD-リジル-プロ  
リン残基であり、A 5がチロシン残基である式 (I) のポリペプチド、A 1、  
A 3及びA 7がアルギニン残基であり、A 2がナフチルアラニン残基であり、  
A 4がリジン残基であり、XがD-リジル-プロリン残基であり、A 5がチ  
20 ロシン残基であり、A 6がシトルリン残基である式 (I) のポリペプチド、  
A 1及びA 3がシトルリン残基であり、A 2がナフチルアラニン残基であり、  
A 4がリジン残基であり、XがD-リジル-プロリン残基であり、A 5がチ  
ロシン残基であり、A 6及びA 7がアルギニン残基である式 (I) のポリペ  
プチド、及びA 1、A 3及びA 7がアルギニン残基であり、A 2がナフチル  
25 アラニン残基であり、A 4がリジン残基であり、XがD-シトルリル-プロ  
リン残基であり、A 5がチロシン残基であり、A 6がシトルリン残基である  
式 (I) のポリペプチドが例示される。

尚、本発明のポリペプチドにおいてA 7のアミノ酸は、ポリペプチドの血  
清中等生体内における安定性の向上の点から、カルボキシル基がアミド化さ

れていることが好ましい。

本発明のポリペプチドの代表的具体例を、公知のT 1 3 4及びT 1 4 0のポリペプチドと合わせて下記表 1 に示した。





上記式のポリペプチドにおいて各記号は国際的に認められた三文字表示によるアミノ酸残基であり、該三文字の前に「D」を付したD-アミノ酸以外は全てL-アミノ酸を示し、Na1はL-3-(2-ナフチル)アラニンを表し、Citは、L-シトルリン〔=2-アミノ-5-ウレイドバレリアン酸〕を表す。

#### 図面の簡単な説明

- 図1は、本発明のポリペプチドTC14003及びTC14005、並びにT140のCDスペクトルである。
- 10 図2は、本発明のポリペプチドTC14012並びにT140の血清中での安定性を示すHPLCチャートである。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 本発明の式(I)のポリペプチドは、ポリペプチド合成法、例えば固相ペプチド合成法、液相ペプチド合成法などによって製造することができる。例えば、固相合成法では、A7に対応するアミノ酸の $\alpha$ -アミノ基を9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基等のウレタン型保護基で保護したN-保護アルギニン(又はリジン)のカルボキシル基を、場合によりカルボキシル基と結合し得るスペーサーを介して(すなわち、アルギニン
- 20 (又はリジン)のカルボキシル基をp-カルボキシメチルベンジルエステルに変換して)、不溶性樹脂に結合させた後、 $\alpha$ -アミノ基の保護基を除去し、N-保護システインを結合反応させ、以下同様にアミノ末端方向に順次アミノ基を縮合させることによって製造することができる。すなわち、下記式
- (I)で示されるアミノ酸配列の12位から1位に対応する保護アミノ酸を
- 25 固相合成法に従って順次結合し、次いで不溶性樹脂及び各アミノ酸に結合した保護基を脱離させて、直鎖状の前記式(I)の本発明のポリペプチドを得ることができる。更に、得られたポリペプチドは、その4位と12位の2つのシステインは、メルカプト基を介してジスルフィド結合(-S-S-)を形成することができる。

1    2    3    4    5    6    7    8    9    10   11   12   13

A1-Arg-A2-Cys-Tyr-A3-A4-X-A5-A6-Cit-Cys-A7    (I)

(式中、

A 1 は、水素原子或いはアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン若  
5 しくはアラニン残基、又はこれらのアミノ酸のN- $\alpha$ 置換誘導体残基を表  
し；

A 2 は、芳香族アミノ酸残基、好ましくはチロシン、フェニルアラニン、  
トリプトファン又はナフチルアラニン残基を表し；

A 3、A 4 及び A 6 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シ  
10 トルリン又はアラニン残基を表し；

A 5 はチロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン又はシ  
トルリン残基を表し；

A 7 は、カルボキシル基がアミド化されていてもよい、リジン又はアルギ  
ニン残基を表し；

15 X は、下記式 (a) : で表されるペプチド残基

1'   2'   3'   4'   5'   6'

-A8-A9-A10-Gly-A11-A12-    (a)

(式中、

A 8 又は A 1 2 は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、  
20 システイン、又はメチオニン残基を表し；

A 9 は、芳香族アミノ酸残基を表し、A 1 0 は、A 3 と同一のアミノ酸残  
基から選択され、

A 1 1 は、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、アラニン、バ  
リン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システイン又はメチオニン残基を  
25 示すが、但し、1' 位と6' 位が共にシステイン残基である場合にはこれら  
はジスルフィド結合により連結していても良い) で示されるペプチド残基、  
或いはD-オルニチル-プロリン、プロリル-D-オルニチン、D-リジル  
-プロリン、プロリル-D-リジン、D-アルギニル-プロリン、プロリル  
-D-アルギニン、D-シトルリル-プロリン、プロリル-D-シトルリン、

D-シトルリル-アラニン、D-アラニル-シトルリン、グリシル-オルニチン、オルニチル-グリシン、グリシル-リジン、リジル-グリシン、グリシル-アルギニン、アルギニル-グリシン、グリシル-シトルリン、シトルリル-グリシン、D-アラニル-プロリン、及びD-リジル-アラニンからなる群より選択されるペプチド残基であり、該ペプチド残基の構成アミノ酸であるD-アルギニン、L-アルギニン、D-リジン、L-リジン、D-オルニチン又はL-オルニチンの側鎖 $\omega$ -アミノ基の水素原子は $\omega$ -アミノアシル基で置換されていてもよく、これらペプチド残基は7位と9位のアミノ酸残基をペプチド結合を介して連結しているペプチド残基を示し；

10 上記式中、Argはアルギニン残基を示し、Cysはシステイン残基を示し、Tyrはチロシン残基を示し、Citはシトルリン残基を示し、Glyはグリシン残基を表し；

上記ポリペプチド又はその塩においては

A1、A3、A4、A5、A6及びA7のいずれかのアミノ酸残基がアラニン又はシトルリン残基であるか、又は；

XがD-シトルリン、D-アラニン、シトルリン、又はアラニン残基を含むペプチド残基である）。

前記のアミノ基を有する不溶性樹脂としては、C末端のN-保護アルギニン（又はリジン）のカルボキシル基又は場合によりこれに結合しているスペーサー（架橋基）と結合可能であり、且つ、ポリペプチド合成後脱離可能なものであれば如何なるものでもよい。

このような不溶性樹脂としては、例えば、アルコ樹脂（p-ベンジルオキシアルコール樹脂）、ベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチルフェノーキシメチル樹脂、Fmoc-NH-SAL樹脂〔（4-（2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノエチル）フェノキシリンカー樹脂）、H. Rink, Tetrahedron Lett., 28: 3787

（1987）, 0.68 mmole/g〕及びこれらの誘導体等が挙げられる。これらの樹脂を用いれば開裂によっていずれも直接目的物を与えるが、収率の点からはアルコ樹脂又はFmoc-NH-SAL樹脂が好ましい。

前述の、場合によりC末端のアミノ酸のカルボキシル基と結合しているスペーサーとしてはカルボキシル基と結合しうる官能基及びカルボキシル基を有するスペーサーが挙げられ、例えばアルギニン（又はリジン）のカルボキシル基をp-カルボキシメチルベンジルエステルに変換しうるものが挙げられるが特に制限はない。

本発明のポリペプチドの合成に用いる保護アミノ酸とは官能基を既知の方法により保護基で保護したアミノ酸であり、各種の保護アミノ酸が市販されている。本発明のポリペプチドを合成する場合には、以下に示す保護基のいずれかを選択するのが好ましい。まず、アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基の保護基としてはBoc（t-ブチルオキシカルボニル）又はFmoc（9-フルオレニルメチルオキシカルボニル）が好ましい。アルギニン（Arg）のグアニジノ基の保護基としてはTos（トシル）、NO<sub>2</sub>（ニトロ）、Mtr（4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル）、Pmc（2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル）又はPbf（2, 2, 4, 6, 7-ペンタヒドロキシジヒドロベンゾフラン-6-スルホニル）が好ましい。システイン（Cys）のメルカプト基の保護基としてはBzl（ベンジル）、4-MeOBzl（4-メトキシベンジル）、4-MeBzl（4-メチルベンジル）、Acm（アセタミドメチル）、Trt（トリチル）、Npys（3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル）、t-Bu（t-ブチル）、t-BuS（t-ブチルチオ）が挙げられるが、4-MeBzl、Acm、Npysが好ましい。チロシン（Tyr）の水酸基の保護基としてはBzl、Cl<sub>2</sub>Bzl（2, 6-ジクロロベンジル）、t-Buが挙げられるが、保護しなくてもよい。リジン（Lys）の $\epsilon$ アミノ基の保護基としてはZ（ベンジルオキシカルボニル）、2-ClZ（2-クロロベンジルオキシカルボニル）、Boc、Npysが挙げられる。各保護基は、

25

ペプチドの合成条件に応じ適当なものをそれ自体既知の保護基の中から選択することが好ましい。

ペプチド合成に際し、保護アミノ酸の結合は、通常の前法、例えば、DCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）法、DIPCDI（ジイソプロピ

ルカルボジイミド) 法 [Tartar, A. ら: J. Org. Chem. 44, 5000 (1979)]、活性エステル法、混合あるいは対称酸無水物法、カルボニルジイミダゾール法、DCC-HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール) 法 [Keonig, W. ら: Chem. Ber., 103, 788, 2024, 2034 (1970)]、ジフェニルホスホリルアジド法等に従って行なうことができるが、DCC法、DCC-HOBt法、DIPCDI-HOBt法、対称酸無水物法が好ましい。これらの縮合反応は、通常、ジクロロメタン、ジメチルホルムアミド等の有機溶媒又はこれらの混合溶媒中で行なわれる。 $\alpha$ -アミノ基の保護基の脱離試薬としては、トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン、HCl/ジオキサン、ピペリジン/ジメチルホルムアミド等が用いられ、該保護基の種類により適宜選択する。また、合成の各段階における縮合反応の進行の程度は、E. カイサーらの方法 [Anal. Biochem., 34, 595 (1970)] (ニンヒドリン反応法) により調べることができる。

上記のようにして、所望のアミノ酸配列を有する保護ポリペプチドを得ることができる。

不溶性樹脂としてアミノメチル樹脂誘導体を用いた場合には、例えば適当な溶媒中においてアンモニアで処理することにより該樹脂から保護ポリペプチドを脱離させることができる。次いで、フッ化水素で処理することにより、前記式で示される、全ての保護基が脱離したポリペプチドアミドが得られる。

20 不溶性樹脂としてベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチルフェノキシメチル樹脂、DMBHA樹脂 [Funakoshi, S. ら; J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1988, 382] を用いた場合には、フッ化水素、TFMSA (トリフルオロメタンスルホン酸) [Academic Press発行、E. Gross編集、Yajima, H.; "The Peptides" vol 5, P65 (1983)]、

25 TMSOTf (トリメチルシリルトリフラート) [Fujii, N. ら; J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1987, 274] 又はTMSBr (トリメチルシリルブロミド) [Fujii, N. ら; Chem. Pharm. Bull., 35, 3880 (1987)] などで処理することにより、該樹脂及び保護基を同時に脱離させることができる。

次いで、所望により、2-メルカプトエタノール、DTT (ジチオスレイ

トール)などで還元することによりシステインのメルカプト基を還元型とした後、酸化処理することによりジスルフィド結合を形成させ、環状ポリペプチドを得ることができる。

この際の酸化処理は、既知の方法を用いることができ、通常、大気中の酸素やフェリシアン酸塩（例えば、フェリシアン化カリウム）のような酸化剤を用いる。

尚、上記ポリペプチドが樹脂に結合した状態で、抗HIV物質を結合させ、本発明のポリペプチドと抗HIV物質の複合体とすることができる。上記抗HIV物質としては、例えば、逆転写酵素阻害剤やHIVプロテアーゼ阻害剤などが挙げられる。

上記逆転写酵素阻害剤としては、HIVの逆転写酵素の活性を阻害する物質であって、ヌクレオシド系及び非ヌクレオシド系の物質が挙げられる。ヌクレオシド系の該阻害剤としては、ピリミジン塩基、プリン塩基、イミダゾール塩基又はトリアゾール塩基のいずれかの塩基と、少なくとも一つの水酸基を有するフラノース又はそのアシクロ体とから構成されるヌクレオシド又はその類縁体が好ましく、例えば、A Z T (CAS REGISTRY NUMBERS: 30516-87-1: ジドブジン (zidovudine) )、d d I (CAS REGISTRY NUMBERS: 6965 5-05-6: ジダノシン (didanosine) )、d d C (CAS REGISTRY NUMBERS: 74 81-89-2: ザルシタピン (zalcitabine) )、2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシチミジン (CAS REGISTRY NUMBERS: 3056-17-5: d 4 T: スタブジン (stavudine) )、3'-チア-2', 3'-ジデオキシシチジン (CAS REGISTRY NUMBERS: 134678-17-4: 3 T C: ラミブジン (lamivudine) )、2'-β-フルオロ-d d C、3'-フルオロチミジン (CAS REGISTRY NUMBERS: 25526-93-6: F L T)、9-(2-ホスホニル-メトキシエチル)-アデニン (CAS REGISTRY NUMBERS: 106941-25-7: P M E A)、6-C l -d d I、6-C l -d d C等が挙げられる。

また非ヌクレオシド系の該阻害剤としては例えば、テトラヒドロ-イミダゾ-ベンゾ-ジアゼピン-オンもしくは-チオン (T I B O) 誘導体（具体的には、(+)-S-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-5-メチル-6-

(3-メチル-2-ブテニル)イミダゾ〔4, 5, 1-j k〕〔1, 4〕ベンゾジアゼピン-2 (1H)-チオン (CAS REGISTRY NUMBERS: 167206-29-3: R 8 2 9 1 3)、

5 ヒドロキシエトキシ-メチルフェニルチオチミン (HEPT) 誘導体、ネビラピン (Nevirapine) (CAS REGISTRY NUMBERS: 129618-40-2)、ピリジノン誘導体

等が挙げられる。

これらのうち、上記ポリペプチドとの結合の容易性とDNA中に取り込まれることによる効果的なDNA合成の阻害機序を考慮すると、ヌクレオシド系10の逆転写酵素阻害剤が好ましく、ヌクレオシド系のHIV転写酵素阻害剤の中でも、好ましくはすでに臨床においてヒトに投与されているAZT、ddI、ddC、ddT又は3TCであり、より好ましくは、該ポリペプチドと化学的に結合して本発明物質とした際に特に相乗的に抗ウイルス活性が増強されるAZTである。これらのヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤等はHIV15がRNAから逆転写によってDNAを合成する際にDNA中に取り込まれ、その結果DNAの合成を阻害するために非天然型ヌクレオシド又はヌクレオシドアナログであることが好ましい。上記ヌクレオシドアナログとは、ヌクレオシドと類似の立体構造をもつ非ヌクレオシド化合物を指す。また、これらの逆転写酵素阻害剤は、市販のものあるいは既知の合成法に従って調製したものを使用することが可能である。20

また、HIVプロテアーゼ阻害剤としては、HIVのプロテアーゼの活性を阻害する物質であって、該プロテアーゼの基質遷移状態ミミック化合物である阻害剤が好ましい。基質遷移状態ミミックとは、酵素の基質結合部位に結合可能な物質で、酵素基質複合体における基質と類似の立体構造を有する物質を指す。例えば、Ro 31-8959 (CAS REGISTRY NUMBERS: 127779-20-8: サキナビル (saquinavir))、A-77003 (CAS REGISTRY NUMBERS: 134878-17-4)、A-80987 (CAS REGISTRY NUMBERS: 144141-97-9)、KNI-93 (CAS REGISTRY NUMBERS: 138258-64-7)、KNI-102 (CAS REGISTRY NUMBERS: 139694-65-8)、KNI-174、KNI-

2 2 7 (CAS REGISTRY NUMBERS: 147384-69-8)、K N I - 2 7 2 (CAS REG  
ISTRY NUMBERS: 147318-81-8)、L - 7 3 5 5 2 7 (CAS REGISTRY NUMBER  
S: 150378-17-9 : インジナビル (indinavir) )、S C - 5 2 1 5 1 (CAS  
REGISTRY NUMBERS: 143224-34-4 : テリナビル (Telinavir) )、V X - 4  
5 7 8、A B T - 5 3 8 (CAS REGISTRY NUMBERS: 155213-67-5 : リトナビル  
(ritonavir) )、D M P - 3 2 3 (CAS REGISTRY NUMBERS: 151867-81-1)、  
U - 9 6 9 8 8 (CAS REGISTRY NUMBERS: 149394-65-0) 等が挙げられる。  
より好ましくは高い抗ウイルス活性を有するR o 3 1 - 8 9 5 9、L - 7  
3 5 5 2 7 及びK N - 2 7 2 が好ましいが特に限定はされない。これらH I  
10 Vプロテアーゼ阻害剤としては、市販のものあるいは既知の合成法に従って  
調製したものを使用することができる。R o 3 1 - 8 9 5 9 については例  
えば、J. Med. Chem. 36, p2300-2310 (1993) に記載の調製法が挙げられる。

上記複合体では、上記ポリペプチドと上記抗H I V活性物質とが化学的に  
結合しているが、その結合が化学的に形成された結合であれば特に限定はさ  
15 れず、具体的には、エステル結合、アミド結合、エーテル結合、ジスルフィ  
ド結合等が挙げられる。これらのうちエステル結合は、結合した抗H I V活  
性物質が生体内の標的細胞内に運搬された後、細胞内エステラーゼ等で切断  
が可能な結合であり抗H I V活性物質の作用点近傍で該抗H I V活性物質を  
遊離しうるが、標的細胞への運搬途中においては容易に切断されることがな  
20 い程度の安定性を有する結合である。したがってエステル結合が最も好まし  
い。

上記複合体の調製方法としては、例えばA Z Tなどの抗H I V物質とピリ  
ジンなどの有機溶媒中で結合させ、ポリペプチドのアミノ末端又はカルボキ  
シル末端と上記抗H I V物質との複合体を調製することも可能である。この  
25 ような複合体を調製するに当たっては、例えばコハク酸やグルタル酸等のス  
ペーサーをポリペプチドと抗H I V物質との間に使用することができる。そ  
の場合は、例えばA Z Tなどの抗H I V物質にジメチルアミノピリジン存在  
下で、コハク酸或いはグルタル酸の無水物を用いてこれらのカルボン酸をエ  
ステル結合させ、次いでその複合体と、上記樹脂に結合した状態のポリペプ



チドのN末端部のアミノ酸の $\alpha$ -アミノ基若しくは $\omega$ -アミノ基とを結合させることができる。本発明のポリペプチドのアミノ末端のアルギニン残基に樹枝状のスペーサー（例えばポリリジンなど）を公知の方法により予め調製しておき、公知の方法（例えばDIPCI-HOBt法）により縮合させて結合させることがも可能である。

尚、上記抗HIV物質の結合と同様の方法により、本発明物質にポリエチレングリコール（米国特許第5342940号等）又はその誘導体、コンドロイチン等のグリコサミノグリカン（米国特許第5310881号、米国特許第4585754号等）、レシチン（米国特許第5109118号、5310958号、5362491号等）等の脂質、各種オリゴ糖を結合したスチレン誘導体ポリマー（Polym. J., 17:567, 1985等）等の生体内半減期延長作用物質を結合させることで、本発明物質の生体内での半減期を延長することも可能である。

このようにして得られたポリペプチドは、それ自体既知のポリペプチドの単離精製手段、例えば、抽出、再結晶、各種クロマトグラフィー（ゲルろ過、イオン交換、分配、吸着、逆相）、電気泳動、向流分配等により単離精製することができるが、とりわけ逆相高速液体クロマトグラフィーによる方法が最も効果的である。

また、このようにして得られたポリペプチドは、カプトガニ由来の公知のポリペプチド、T134及びT140と同様に、エンドトキシン結合能、抗菌活性、エンドトキシン感作血球溶血性、抗ウイルス活性を有していると考えられるが、殊にヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対して良好な抗ウイルス活性を示し、その細胞毒性は、従来のT134及びT140に比べて大幅に減少した。

本発明の、式（I）で示されるポリペプチドは、構成するアミノ酸の特徴から塩基性を示すので酸付加により形成した塩の形態としてもよい。例えば、式（I）で示されたポリペプチドは無機酸（塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸など、）又は有機カルボン酸（酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、サリチル酸など）若しくは有機ス

ルホン酸（メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸など）との塩を形成する。本発明の式（I）で示されるポリペプチドは、これらの医薬として許容し得る塩として医薬組成物の有効成分として用いることができる。

- 尚、式（I）のポリペプチドは、CXCR4リガンドに特異的に結合する働きを有しており、その特異性により抗HIVウイルス活性を示すと考えられるが、抗HIVウイルス剤の他にもCXCR4リガンドが関与している疾病であるガン、急性リンパ腫、骨肉腫、異所性骨形成、リウマチなどの治療のための医薬組成物として利用することもできると考えられる。

## 10 実施例

### <ポリペプチドの製造>

#### ポリペプチドTC14005の製造

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TC14005)

## 15 1. TC14005保護ポリペプチド樹脂の合成

- 最初の14位（式（I）の13位）アルギニンを導入したアルコ樹脂のFmoc-Arg(Pbf)-OH (0.74mg/g) 270mg (0.2mmol) からFmoc基を20%ピペリジン/DMFで除去後、アルコ樹脂に対し、13位（式（I）の12位）に相当するFmoc-Cys(Trt)-OH (2.5eq)を加えDMF中、DIPCDI-HOBt法により縮合反応を行った。縮合反応の進行の程度は、Kaiser.Eら (Anal. Biochem., 34:595 (1970)) のニンヒドリン試験により調べた。

### 2. 12位～1位アミノ酸の導入

- 以下同様にして、順次に、Cit、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Pro、D-Cit、Lys(Boc)、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)、Cys(Trt)、Nal、Arg(Pbf)、Arg(Pbf)残基をDMBHA樹脂に導入して保護基保護化ポリペプチド(I)樹脂を得た。

### 3. 脱保護基、樹脂からのポリペプチドの分離及び精製

保護基保護化ポリペプチド(1)樹脂は、20%ピペリジン/DMF処理

- によりFmoc基を除去し、次いで該樹脂100mg当り1M-TMSBr-  
チオアニソール/TFA（トリフルオロ酢酸）系（m-クレゾール（100  
eq）、エタンジチオール（300eq）が存在するトリフルオロ酢酸10ml）  
で25℃、2時間反応させた。反応混合物から樹脂を濾別し、トリフルオロ  
5 酢酸1mlで2回洗浄し、濾液、洗液を合わせたものに氷冷乾燥エーテル10  
0mlを加え、生じた沈殿物を遠心分離し、残渣をデカンテーションにより上  
澄みから分離した。得られた残渣を冷エーテルで洗浄し、4N酢酸10mlに  
溶解し、830mg（80eq）のジチオスレイトールを加え、その混合溶液を  
1夜攪拌した。反応溶液を遠心分離し、上澄みをセファデックスG-10  
10 （ファルマシア社製：3.7×50cm）で処理し、4N酢酸でゲル濾過し、  
素通り画分である主溶出部分を集め、凍結乾燥して粉末状の部分精製未環化  
ポリペプチドTC14005を得た。

#### 4. 空気酸化による環化

- 上述のポリペプチドの1/2量を濃アンモニア水でpH7.5に調整し、通  
15 気による空気酸化を行い環化させた。空気酸化終了後、環化されたポリペ  
プチドをダイアオンHP-20樹脂（三菱化学株式会社製）10gに吸着させ、  
次いで60%アセトニトリル（1N酢酸中）を用いて脱着溶出した。該溶出  
液を室温下で減圧濃縮してアセトニトリルを除去し、更に凍結乾燥により粉  
末とした。更に、該粉末を水に溶解し、HPLC（コスモジール5C18ARI  
20 Iカラム：アセトニトリル傾斜溶出）により精製し単一ピークのポリペプ  
チドを得た。純度は、HPLCにより確認した。

$[\alpha]_D(c. 0.1 : H_2O) : +42.73$

イオンスプレーマススペクトル（IS-MS）： $(C_{90}H_{140}N_{34}O_{19}S_2)$

計算値：2066.43 実測値：2067

- 25 （トリプルステージ四重極型質量分析装置APIII（Perkin-Elmer Scie  
X）

ポリペプチドTC14012の製造

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH<sub>2</sub> (TC1  
4012)

## 1. TC14012 保護ポリペプチド樹脂の合成

Fmoc-NH-SAL樹脂 (0.68 mmole/g) 1.47 g (1 mmole) のFmoc基を20%ピペリジン/DMFで除去後、NH-SAL樹脂に対して14位に相当するFmoc-Arg (Pbf) -OH (2.5 eq) を加えDIPCDI-HOBtにより縮合反応を行った。

## 2. 13位～1位アミノ酸の導入

以下同様にして、順次に、Cys (Trt), Cit, Arg (Pbf), Tyr (t-Bu), Pro, D-Cit, Lys (Boc), Cit, Tyr (t-Bu), Cys (Trt), Nal, Arg (Pbf), Arg (Pbf) 残基をNH-SAL樹脂に導入して官能基保護化ポリペプチド樹脂を得た。

その後、TC14005の合成の時と同様にして、脱保護基、樹脂からのポリペプチドの分離及び精製を行い、空気酸化によって環化を行ってTC14012を得た。

収量 1.432 g (収率59%)

15  $[\alpha]_D^{25} (c\ 0.41 : H_2O) : -60.67$

イオンスプレーマススペクトル (IS-MS) :  $(C_{90}H_{140}N_{34}O_{19}S_2)$

計算値 : 2066.43 実測値 : 2065.73

(トリプルステージ四重極型質量分析装置APIII (Perkin-Elmer Scie  
20 X)

同様にして、表1に示した本発明の他のポリペプチドを合成し、IS-MSを下記表2に示した。

	式	I S - M S (計算値)	I S - M S (実測値)
TA14001	$C_{87}H_{134}N_{30}O_{18}S_2$	1952. 33	1952
TA14005	$C_{87}H_{134}N_{30}O_{18}S_2$	1952. 33	1953
TA14006	$C_{87}H_{134}N_{32}O_{18}S_2$	1980. 34	1981
TA14007	$C_{87}H_{134}N_{32}O_{18}S_2$	1980. 34	1981
TA14008	$C_{87}H_{139}N_{33}O_{18}S_2$	2011. 40	2012
TA14009	$C_{84}H_{137}N_{33}O_{17}S_2$	1945. 34	1948
TA14010	$C_{87}H_{134}N_{30}O_{18}S_2$	1952. 33	1953
TC14001	$C_{90}H_{140}N_{32}O_{19}S_2$	2038. 42	2039
TC14003	$C_{90}H_{140}N_{32}O_{19}S_2$	2038. 42	2038
TC14004	$C_{90}H_{140}N_{34}O_{19}S_2$	2066. 43	2067
TC14006	$C_{90}H_{140}N_{32}O_{19}S_2$	2038. 42	2037
TC14011	$C_{90}H_{139}N_{33}O_{20}S_2$	2067. 42	2068
TC14018	$C_{90}H_{140}N_{34}O_{19}S_2$	2066. 43	2066
TC14020	$C_{90}H_{140}N_{34}O_{19}S_2$	2066. 43	2066
TN14003	$C_{90}H_{141}N_{33}O_{18}S_2$	2037. 43	2038
TN14005	$C_{90}H_{141}N_{35}O_{18}S_2$	2065. 45	2066

なお、旋光度として、以下の値を得た。

TC14003:  $[\alpha]_D (c. 0.1 : H_2O) : 0$

TC14011:  $[\alpha]_D (c. 0.1 : H_2O) : -47.61$

TC14018:  $[\alpha]_D (c. 0.1 : H_2O) : -25.51$

5 TC14020:  $[\alpha]_D (c. 0.1 : H_2O) : -41.74$

TN14003:  $[\alpha]_D (c. 0.1 : H_2O) : -37.09$

TN14005:  $[\alpha]_D (c. 0.1 : H_2O) : -27.58$

本発明のポリペプチドTC14003及びTC14005のCDスペクトルを測定した。1cmセルを用いてJ-720 spectropolarimeter (JASCO社製)を用い、1nm間隔で5回測定し、5回の平均値を求め、従来のT140のCDスペクトルと一緒に図1に示した。210nm近辺のマイナスピークと197nm近辺の強いプラスピークが観察されたので、これらのペプチドがβ-シート構造を有していることが明らかとなった。

#### <抗HIV活性及び細胞毒性>

15 HIV-1に予め感染させたMOLT/HIV-1 (IIIB) 細胞から得られたHIV-1 (IIIB) 株を使用した。HIV感染させたMT-4細胞に、本発明のポリペプチドを種々の濃度で添加し、37℃で5日間培養した後の生存細胞数を3'-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリニウムブロミド (MTT) 法を用いて決定した。抗HIV活性は、HIV感染によるMT-4細胞死を50%抑制する濃度 (EC<sub>50</sub>値) で表す。本発明のペプチドの細胞毒性は、種々の濃度の本発明のポリペプチドをウイルス非感染MT-4細胞と共に培養し、生存細胞数をMTT法を用いて決定し、50%生存濃度で表した (試験I: CC<sub>50</sub>値)。更に、ヒト抹消血単球 (PBMC) での生存数をトリパンブルー染色法により  
25 決定し、50%生存濃度でも表した (試験II: CC<sub>50</sub>値)。各CC<sub>50</sub>値とEC<sub>50</sub>値の比を、選択係数 (SI) として表した。公知のポリペプチドT134及びT140、並びに医薬品と使用されている抗HIV化合物: 3'-アジド-2', 3'-ジデオキシチミジン (AZT) を対照の抗HIV剤として得た値を表にまとめた。

化合物	荷電	EC <sub>50</sub> (nM)	CC <sub>50</sub> (μM)		SI	
			(試験 I)	(試験 II)	CC <sub>50</sub> (試験 I) /EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub> (試験 II) /EC <sub>50</sub>
T134	7	8.3	>>1	190	>>120	23000
T140	7	3.3	>>1	96	>>300	29000
TA14001	6	56	>40	N. T.	>750	N. T.
TA14005	6	9.3	>40	N. T.	>4500	N. T.
TA14006	6	47	>80	N. T.	>1800	N. T.
TA14007	6	16	>80	N. T.	>5200	N. T.
TA14008	7	17	>80	N. T.	>4700	N. T.
TA14009	7	17	>80	N. T.	>4500	N. T.
TA14010	6	18	>80	N. T.	>4800	N. T.
TC14003	6	2.8	>80	310	>29000	160000
TC14004	6	16	>80	270	>5000	16000
TC14005	6	4.0	>80	280	>20000	69000
TC14006	6	15	>80	310	>5300	20000
TC14011	5	0.5	>100	N. T.	>200000	N. T.
TC14012	6	0.4	>100	N. T.	>250000	N. T.
TC14018	6	1.2	>100	N. T.	>83000	N. T.
TC14020	6	2.7	>100	N. T.	>37000	N. T.
TN14003	6	0.6	>100	N. T.	>166000	N. T.
TN14005	6	4.6	>100	N. T.	>21000	N. T.
AZT		48	190	<20	4000	<410

荷電は、それぞれのペプチドの全陽荷電の数であり；全ての値は、少なくとも3回の測定値の平均値であり；NTは、試験されていないこと示す。

- 上記の表から、本願の化合物、特にTC14003、TC14005、TC14020、及びTN14005は、公知のT140に比べ、抗HIV活性はほぼ同等であるが、細胞毒性が大幅に低下していることが明らかである。そして、TC14011、TC14012、TC14018、TC14020、及びTN14003は、細胞毒性の低下に加え、更に高い抗HIV活性を有していることが明かである。

#### <血清中での安定性>

- 10 T140、又はTC14012を100nmolでネコ血清（100 $\mu$ L/100 $\mu$ L Water）に溶解し、37 $^{\circ}$ Cで保温した。0時間、1時間、2時間、5時間、及び16時間経過後、それぞれ8 $\mu$ Lずつ採取し、16%アセトニトリルを使用した逆相HPLCにより解析した。その結果、T140は16時間経過時点で、約70%が分解していたのに対し、TC14012はほとんど分解が観察されなかった（図2）。

このことは本発明のポリペプチドのカルボキシル末端をアミド化することが、血清中でのポリペプチドの安定性を格段に向上することを示している。

#### 配列表フリーテキスト

- 20 配列番号1：カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、8Xaa：D-Lys、12Xaa：L-シトルリン
- 配列番号2：カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3Xaa：L-3-（2-ナフチル）アラニン、12Xaa：L-シトルリン
- 25 配列番号3：カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3Xaa：L-3-（2-ナフチル）アラニン、8Xaa：D-Lys、12Xaa：L-シトルリン
- 配列番号4：カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3Xaa：L-3-（2-ナフチル）アラニン、8X



aa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

配列番号5 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3 Xaa : L-3-(2-ナフチル)アラニン、8 Xaa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

- 5 配列番号6 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3 Xaa : L-3-(2-ナフチル)アラニン、8 Xaa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

配列番号7 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3 Xaa : L-3-(2-ナフチル)アラニン、8 X

- 10 aa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

配列番号8 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3 Xaa : L-3-(2-ナフチル)アラニン、8 Xaa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

- 15 配列番号9 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3 Xaa : L-3-(2-ナフチル)アラニン、8 Xaa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

配列番号10 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、1 Xaa : L-シトルリン、3 Xaa : L-3-(2-ナフチル)アラニン、8 Xaa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

- 20

配列番号11 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3 Xaa : L-3-(2-ナフチル)アラニン、6 Xaa : L-シトルリン、8 Xaa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

- 25 配列番号12 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づきデザインしたペプチド、3 Xaa : L-3-(2-ナフチル)アラニン、7 Xaa : L-シトルリン、8 Xaa : D-Lys, 12 Xaa : L-シトルリン

配列番号13 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づき

デザインしたペプチド、3 X a a : L - 3 - ( 2 - ナフチル ) アラニン、8 X a a : D - シトルリン、12 X a a : L - シトルリン

配列番号 14 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づき  
デザインしたペプチド、3 X a a : L - 3 - ( 2 - ナフチル ) アラニン、8

- 5 X a a : D - L y s、11 X a a : L - シトルリン、12 X a a : L - シトルリン

配列番号 15 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づき  
デザインしたペプチド、3 X a a : L - 3 - ( 2 - ナフチル ) アラニン、6 X a a : L - シトルリン、8 X a a : L - L y s、12 X a a : L - シトル

- 10 リン

配列番号 16 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づき  
デザインしたペプチド、1 X a a : L - シトルリン、3 X a a : L - 3 - ( 2 - ナフチル ) アラニン、8 X a a : D - シトルリン、12 X a a : L - シトルリン

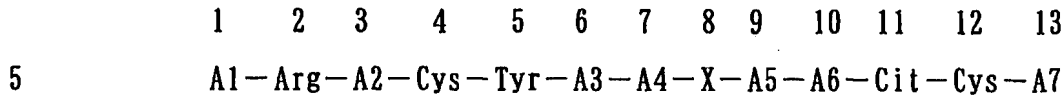
- 15 配列番号 17 : カプトガニのタキプレシンファミリーポリペプチドに基づき  
デザインしたペプチド、3 X a a : L - 3 - ( 2 - ナフチル ) アラニン、8 X a a : D - シトルリン、11 X a a : L - シトルリン、12 X a a : L - シトルリン

## 20 産業上の利用可能性

本発明によれば、低細胞毒性であり、かつ高い抗HIV活性を有する新規ポリペプチドを提供できる。

## 請求の範囲

## 1. 下記式 (I)



(I) (式中、

A 1 は、水素原子或いはアルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン若しくはアラニン残基、又はこれらのアミノ酸のN- $\alpha$ 置換誘導体残基を表し；

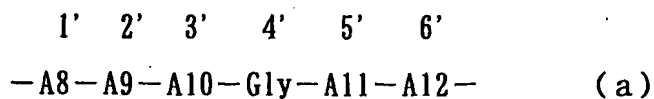
10 A 2 は、芳香族アミノ酸残基を表し；

A 3、A 4 及び A 6 は、独立して、アルギニン、リジン、オルニチン、シトルリン又はアラニン残基を表し；

A 5 は、チロシン、フェニルアラニン、アラニン、ナフチルアラニン又はシトルリン残基を表し；

15 A 7 は、カルボキシル基がアミド化されていてもよい、リジン又はアルギニン残基を表し；

X は、下記式 (a)：



20 (式中、

A 8 及び A 1 2 は、独立して、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システイン、又はメチオニン残基を表し；

A 9 は、芳香族アミノ酸残基を表し、A 1 0 は、A 3 と同一のアミノ酸残基から選択され、A 1 1 は、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、  
 25 アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システイン又はメチオニン残基を表すが、但し、1' 位と6' 位が共にシステイン残基である場合には、これらは、ジスルフィド結合により連結していても良い) で示されるペプチド残基、或いはD-オルニチル-プロリン、プロリル-D-オルニチン、D-リジル-プロリン、プロリル-D-リジン、D-アルギニル-プ

ロリン、プロリル-D-アルギニン、D-シトルリル-プロリン、D-シトルリル-アラニン、D-アラニル-シトルリン、プロリル-D-シトルリン、グリシル-オルニチン、オルニチル-グリシン、グリシル-リジン、リジル-グリシン、グリシル-アルギニン、アルギニル-グリシン、グリシル-シトルリン、シトルリル-グリシン、D-アラニル-プロリン、及びD-リジル-アラニンからなる群より選択されるペプチド残基であり、該ペプチド残基の構成アミノ酸であるD-アルギニン、L-アルギニン、D-リジン、L-リジン、D-オルニチン又はL-オルニチンの側鎖 $\omega$ -アミノ基の水素原子は $\omega$ -アミノアシル基で置換されていてもよく、これらペプチド残基は7位と9位のアミノ酸残基をペプチド結合を介して連結しているペプチド残基を示し；

上記式中、Argはアルギニン残基を示し、Cysはシステイン残基を示し、Tyrはチロシン残基を示し、Citはシトルリン残基を示し、Glyはグリシン残基を示し、4位と12位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよく；

但し、上記ポリペプチド又はその塩においては

A1、A3、A4、A5、A6及びA7のいずれかのアミノ酸残基がアラニン若しくはシトルリン残基であるか、又は；

XがD-シトルリン、D-アラニン、シトルリン、若しくはアラニン残基を含むペプチド残基である)で示されるポリペプチド又はその塩。

2. 請求の範囲第1項記載のポリペプチドにおいて、A1がアルギニン、アラニン又はシトルリン残基であり、A2がトリプトファン又はナフチルアラニン残基であり、A3がアルギニン、アラニン又はシトルリン残基であり、A4がリジン、アラニン又はシトルリン残基であり、XがD-リジル-プロリン、D-アラニル-プロリン、D-リジル-アラニン又はD-シトルリル-プロリン残基であり、A5がチロシン又はアラニン残基であり、A6がアルギニン、アラニン又はシトルリン残基であり、A7がアルギニン残基であるポリペプチド又はその塩。

3. 請求の範囲第1項記載のポリペプチドにおいて、A2がナフチルアラ

ニン残基であり、A 4 がリジン残基であり、A 5 がチロシン残基であり、A 7 がアルギニン残基であるポリペプチド又はその塩。

4. 請求の範囲第 3 項記載のポリペプチドにおいて、A 3 及び A 6 がアルギニン残基であり、X が D-リジループロリン残基であるポリペプチド又はその塩。

5. 請求の範囲第 3 項記載のポリペプチドにおいて、A 3 がアルギニン残基であり、X が D-シトルリループロリン残基であるポリペプチド又はその塩。

6. 請求の範囲第 3 項記載のポリペプチドにおいて、A 3 がシトルリン残基であるか、又は X が D-シトルリループロリン残基であるポリペプチド又はその塩。

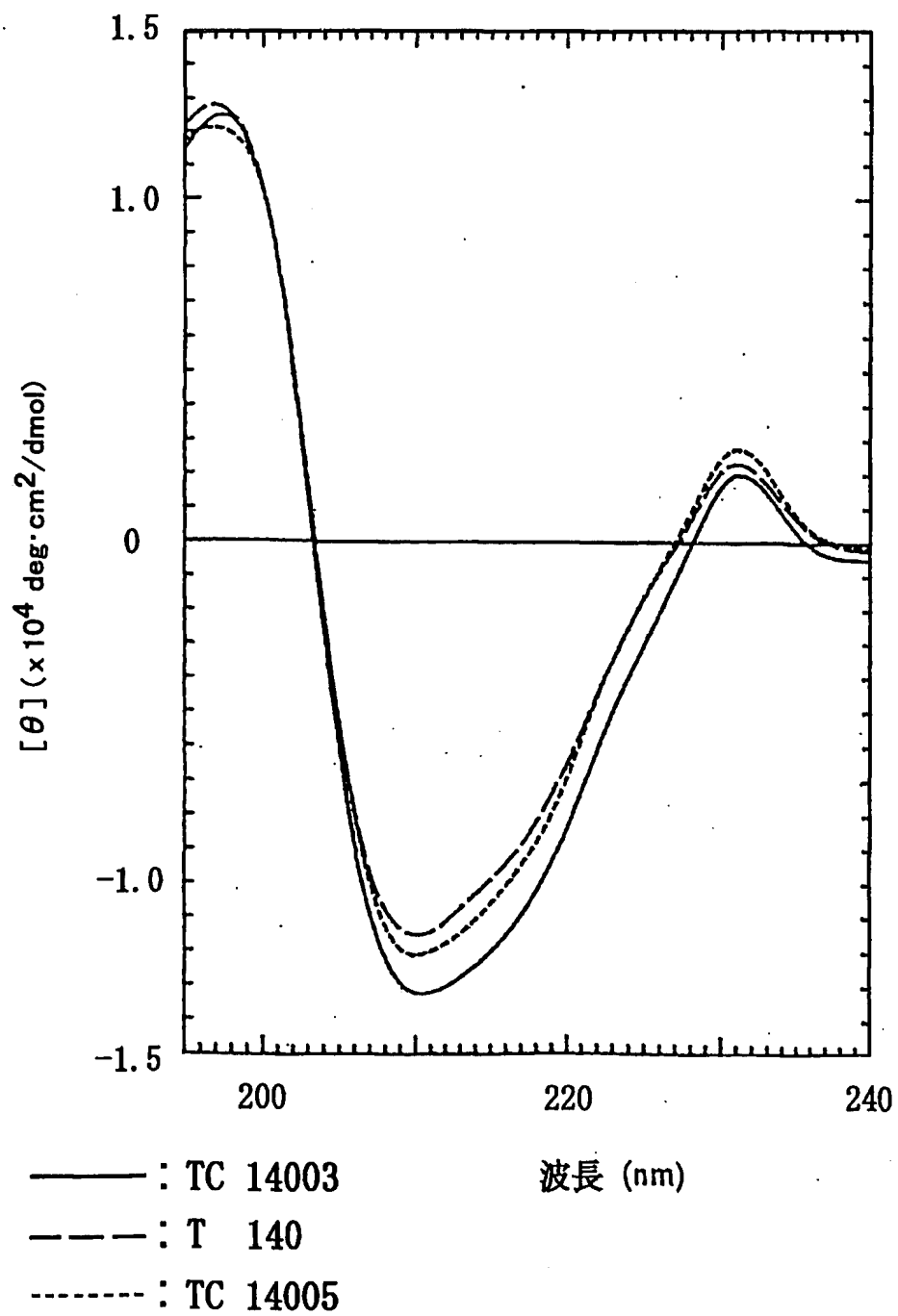
7. 請求の範囲第 1 項乃至第 6 項記載のポリペプチドにおいて、A 7 が、カルボキシル基がアミド化されたりジン又はアルギニンであることを特徴とするポリペプチド又はその塩。

8. 請求の範囲第 1 乃至 7 記載のポリペプチドに逆転写酵素阻害剤、H I V プロテアーゼ阻害剤、または生体内半減期延長物質が結合した複合体。

9. 請求の範囲第 1 項乃至 7 のいずれか 1 項記載のポリペプチド又はその塩、又は請求の範囲第 8 項記載の複合体を有効成分とする医薬。

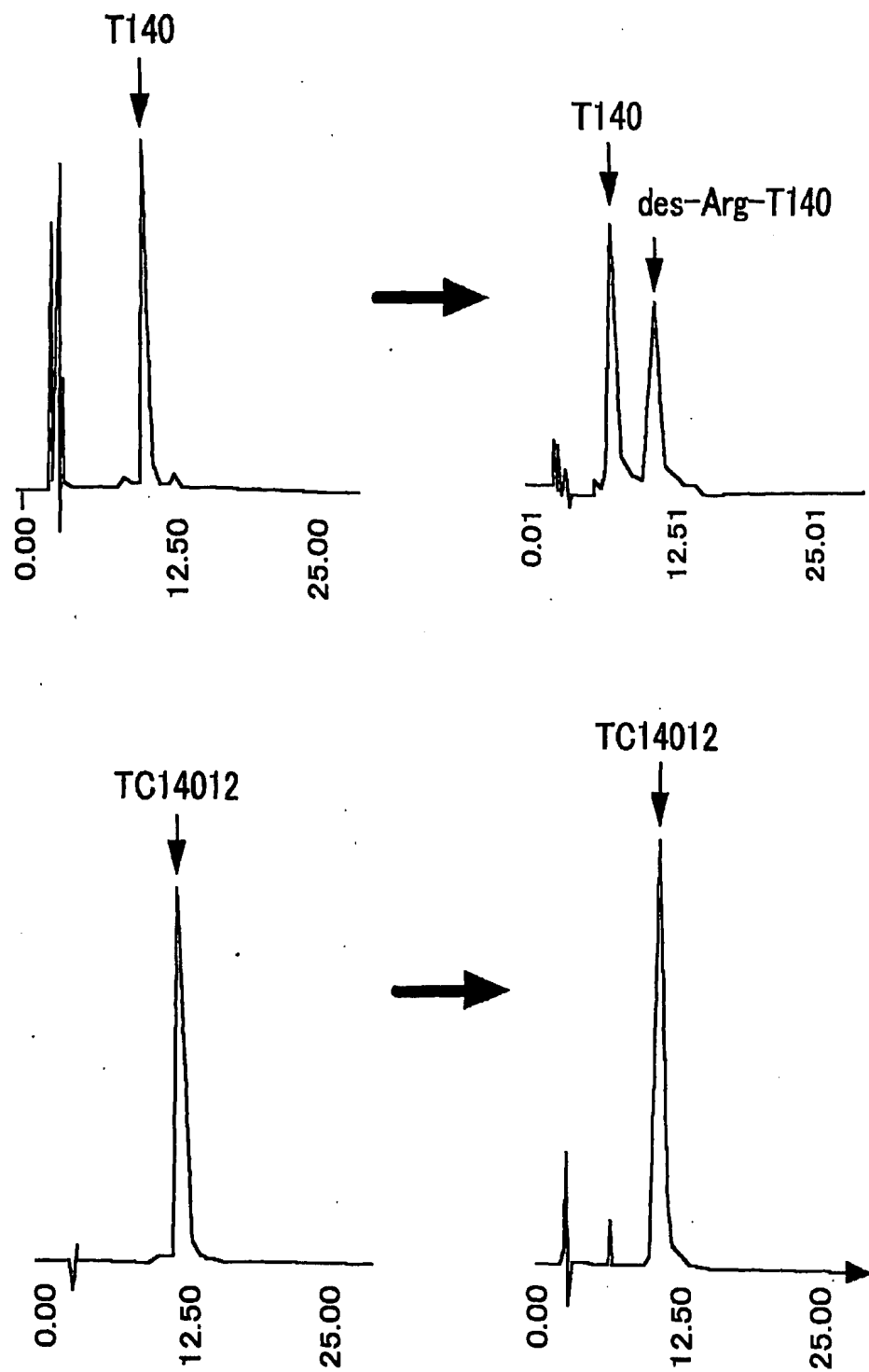
1/2

図 1



2/2

図 2



1/7

## Sequence Listing

&lt;110&gt; Seikagaku Corporation

&lt;120&gt; New polypeptides and anti-HIV agent containing thereof

&lt;130&gt; KP-9939

&lt;160&gt; 14

&lt;210&gt; 1

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 2

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 3



2/7

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Ala Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 4

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Ala Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 5

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

3/7

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Ala Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 6

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 7

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Ala Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 8

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

4/7

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Ala Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 9

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Ala Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 10

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

1Xaa: L-Citrulline, 3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Xaa Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5/7

5

10

&lt;210&gt; 11

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 6Xaa: L-Citrulline, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Xaa Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 12

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 7Xaa: L-Citrulline, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Xaa Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 14

&lt;220&gt;

&lt;212&gt; PRT

6/7

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Citrulline, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 14

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Lys, 11Xaa: L-Citrulline, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Xaa Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 15

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 6Xaa: L-Citrulline, 8Xaa: D-Lys, 12Xaa: L-Citrulline

7/7

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Xaa Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 16

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

1Xaa: L-Citrulline, 3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Citrulline, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Xaa Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

5

10

&lt;210&gt; 17

&lt;220&gt;

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Designed peptide based on tachyplesin family polypeptide of horseshoe crab

3Xaa: L-3- (2-Naphtyl) alanine, 8Xaa: D-Citrulline, 11Xaa: L-Citrulline, 12Xaa: L-Citrulline

&lt;400&gt;

Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Xaa Xaa Cys Arg

5

10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07668

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/08, A61K38/04, A61P31/18, C12N9/99

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/08, A61K38/04, A61P31/18, C12N9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Akane OMAGARI et al., Development of Specific CXCR4 Inhibitors Based on an Anti-HIV Peptide, T140, and Their Structure-Activity Relationships Study, Pept.Sci., 2001, Vol.2000, No.37th, pages 129-132	1-9
PX	Hirokazu TAMAMURA et al., Pharmacophore Identification of a Specific CXCR4 Inhibitor, T140, Leads to Development of Effective Anti-HIV Agents with Very High Selectivity Indexes, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Vol.10, No.23, pages 2633-2637	1-9
PA	Kazuko GOTOH et al., Increase of R5 HIV-1 infection and CCR5 expression in T cells treated with high concentrations of CXCR4 antagonists and SDF-1, J Infect Chemother, 2001, Vol.7, No.1, pages 28-36	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 November, 2001 (21.11.01)Date of mailing of the international search report  
11 December, 2001 (11.12.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07668

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hirokazu TAMAMURA et al., HIV-cell Fusion Inhibitors Targeted to the HIV Second Receptor: T22 and Its Downsized Analogs with High Activity, Pept. Sci., 1999, Vol.1998, No.35th, pages 49-52	1-9
A	Hirokazu TAMAMURA et al., A Low-Molecular-Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor CXCR4: A Strong Anti-HIV Peptide T140, Biochem.Biophys.Res.Comm., 1998, Vol.253, No.3, pages 877-882	1-9
A	Hirokazu TAMAMURA et al., Effective lowly cytotoxic analogs of an HIV-cell fusion inhibitor, T22([Tyr5,12,Lys7]-polyphemusin II), Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1997, Vol.6, No.2, pages 231-238	1-9
PA	WO 01/64716 A1 (Nobutaka FUJII), 07 September, 2001 (07.09.01) (Family: none)	1-9



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C07K7/08, A61K38/04, A61P31/18, C12N9/99

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C07K7/08, A61K38/04, A61P31/18, C12N9/99

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Akane OMAGARI. et al., Development of Specific CXCR4 Inhibitors Based on an Anti-HIV Peptide, T140, and Their Structure-Activity Relationships Study, Pept. Sci., 2001, Vol. 2000, No. 37th, p. 129-132	1-9
PX	Hirokazu TAMAMURA. et al., Pharmacophore Identification of a Specific CXCR4 Inhibitor, T140, Leads to Development of Effective Anti-HIV Agents with Very High Selectivity Indexes, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Vol. 10, No. 23, p. 2633-2637	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
21.11.01

国際調査報告の発送日  
11.12.01

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
本間 夏子



4N 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	Kazuko GOTOH. et al., Increase of R5 HIV-1 infection and CCR5 expression in T cells treated with high concentrations of CXCR4 antagonists and SDF-1, J Infect Chemother, 2001, Vol.7, No.1, p.28-36	1-9
A	Hirokazu TAMAMURA. et al., HIV-cell Fusion Inhibitors Targeted to the HIV Second Receptor: T22 and Its Downsized Analogs with High Activity, Pept. Sci., 1999, Vol.1998, No.35th, p.49-52	1-9
A	Hirokazu TAMAMURA. et al., A Low-Molecular-Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor CXCR4: A Strong Anti-HIV Peptide T140, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, Vol.253, No.3, p.877-882	1-9
A	Hirokazu TAMAMURA. et al., Effective lowly cytotoxic analogs of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 ([Tyr <sup>5,12</sup> , Lys <sup>7</sup> ]-polyphemusin II), Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1997, Vol.6, No.2, p.231-238	1-9
PA	WO 01/64716 A1 (藤井信孝) 7.9月.2001 (07.09.01) (ファミリーなし)	1-9